

团 体 标 准

T/ZHCA xxx-2022

化妆品修护功效体外测试方法 人源成纤维细胞迁移能力试验

Evaluation of *in vitro* repairing efficacy for cosmetics

——Human fibroblast migration ability detection

(征求意见稿)

2022-xx-xx 发布

2023-xx-xx 实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省食品药品检验研究院提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品修护功效体外测试方法 人源成纤维细胞迁移能力试验

1 范围

本文件规定了一种化妆品修护功效的体外测试方法。
本文件适用于采用人源成纤维细胞迁移能力试验评价化妆品及原料的修护功效。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性文件。

3 术语及定义

3.1

成纤维细胞 Fibroblast

普遍存在于疏松结缔组织中的一种中胚层来源的细胞。分泌前胶原、纤连蛋白和胶原酶等细胞外基质，伤口愈合过程中可迁移到伤口进行增殖。

3.2

细胞迁移 Cell Migration

也称为细胞爬行、细胞移动或细胞运动，是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度而产生的移动。细胞迁移为细胞头部伪足的延伸、新的黏附建立、细胞体尾部收缩在时空上的交替过程。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一，是机体正常生长发育的生理过程，也是活细胞普遍存在的一种运动形式。

4 试验原理

细胞迁移能力试验，也可以称为划痕试验、愈合试验，是当细胞长到融合成单层状态时，在单层细胞上人为划出一个空白区域，称为“划痕”，划痕边缘的细胞逐渐进入空白区域使“划痕”愈合，在一定程度上模拟了体内细胞迁移的过程。使用不同的物质处理细胞，对细胞产生影响，可能会产生促进细胞迁移的作用。

细胞迁移在体内的生理活动中包括了对微小伤口的愈合作用，这与化妆品淡化皮肤纹理、促进皮肤损伤愈合的修护功效的目的相似。同时，成纤维细胞是真皮层中疏松结缔组织的主要细胞成分，人源成纤维细胞模型的结果对体内作用有一定的参考性。故选用人源成纤维细胞进行细胞迁移试验，可以评价化妆品的修护功效。

5 试剂和材料

- 5.1 细胞：人源成纤维细胞（扩增至P7代进行试验）
- 5.2 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：GIBCO；
- 5.3 胰酶（0.25%）：GIBCO；
- 5.4 新生牛血清（NBS）：浙江天杭生物科技有限公司；
- 5.5 细胞培养液（DMEM，低糖）：GIBCO；
- 5.6 噻唑蓝（MTT）溶液：取噻唑蓝粉末（阿拉丁，CAS：298-93-1，分析纯）配制成1mg/ml的储备液，过滤除菌，避光保存；
- 5.7 细胞培养瓶：Corning；
- 5.8 血清移液管：Falcon；
- 5.9 离心管：Corning；
- 5.10 细胞培养板：Corning；

6 仪器

- 6.1 倒置显微镜：具有拍摄功能；
- 6.2 二氧化碳培养箱；
- 6.3 电子天平：分度值为0.1mg；
- 6.4 水平低速离心机；
- 6.5 移液器：量程包含100-1000 μ l、20-200 μ l、2-20 μ l；
- 6.6 生物安全柜；
- 6.7 酶标仪；
- 6.8 微孔板振荡器；
- 6.9 计算机：能够运行ImageJ软件。

7 试验步骤

7.1 预试验（细胞毒性试验）

7.1.1 铺板

预试验选用MTT法进行。选用生长良好的P7代的人源成纤维细胞，消化后稀释到合适的浓度，加入96孔板中。边缘孔使用无菌PBS填充，减少蒸发。放入培养箱中孵育24h左右。

7.1.2 加样

孵育结束后，检查细胞贴壁情况，铺板率达到70-80%后即可加入受试物。受试物应当天配制，使用无血清培养液溶解，按照合适的倍数进行逐级稀释，一般设置7个或以上的浓度组。无法直接溶于水的样品，可用DMSO稀释后进行配制。设置空白对照组，仅加入无血清培养基。对照组与样品组每个浓度设置6个复孔。吸出培养液，加入样品后，放入培养箱内孵育24h左右。

7.1.3 测定

在孵育约20h、测定前4h在培养板中加入MTT溶液至终浓度为0.25mg/ml左右，继续孵育4h后，吸除上清，每孔加入150μl DMSO，低速振荡10分钟，于酶标仪570nm处测定吸光度。

7.1.4 计算

获得吸光度数据后，计算样品组与空白对照组的吸光度之比，得到对应的细胞存活率。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{样品组平均吸光度}}{\text{空白对照组平均吸光度}} \times 100$$

7.2 正式试验（细胞迁移能力试验）

7.2.1 浓度选择

预试验后获得细胞存活率数据，应与样品浓度应具有近似的线性关系。正式试验时，应根据样品剂量-细胞存活率梯度选择2-3个浓度，按照以下原则进行：

- a) 最高无明显毒性剂量（细胞存活率达到90%左右时的最高剂量）；
- b) 最低无毒性剂量（细胞存活率达到100%或更高时的最低剂量）；

所有的样品的最高浓度为其在无血清培养基中的最大溶解度。在获得正式试验阳性结果之前，可以适当调整浓度选择。

7.2.2 铺板

准备6孔或24孔细胞培养板，在背面用记号笔横向划直线进行标记。选用生长良好的P7代的人源成纤维细胞，消化后稀释到合适的浓度，加入孔板中，放入培养箱中孵育24h左右。

7.2.2 加样

检查细胞贴壁情况，铺板率达到80-90%后即可进行加样。吸除原培养液，加入配制好的受试物。受试物应当天配制，使用无血清培养液溶解，按照合适的倍数进行逐级稀释，一般设置2-3个浓度组。无法直接溶于水的样品，可用DMSO稀释后进行配制（DMSO终浓度不大于0.5%）。试验设置空白对照组、阳性对照组与样品组，分别加入无血清培养基、10%血清培养基与无血清培养基配制的样品。加样结束后，将细胞培养板放入培养箱中孵育24h左右。

7.2.3 划痕

观察细胞铺板率达到90%左右，使用1ml移液器枪头进行划痕，划痕过程中，枪头略微倾斜于平面，垂直于记号笔标记，均匀用力划过板底。紧贴划痕与记号笔标记的交叉点的上方或下方为观察点，每个孔应有4个以上的观察点。划痕结束后，使用PBS轻轻清洗2-3次，除去漂浮细胞。

7.2.4 拍照

划痕结束后立刻进行0h拍照，记录原始划痕大小，并记录观察点序号，每个孔拍摄4张或更多的照片。应对观察点的顺序做好定义。每次拍照应定位记号笔标记的相对位置，保证标记位于画面边缘的同一位置。拍照结束后，吸除PBS，每孔加入无血清培养基，放回培养箱内继续孵育24h左右。孵育结束后，按照0h拍照的观察点，使用同样倍数的物镜进行同一位置的24h拍照，记录划痕修复情况。

7.3 图片处理

7.3.1 图片统一化处理

获得照片后，进行统一化处理。首先根据照片中的记号笔标记，拉平图片。设置适当尺寸的画板（适当尺寸指像素数略小于图片尺寸，但能基本包含所有划痕所在区域），拖入原始划痕图片，以记号笔标记为基准定位到同一位置，裁切划痕图片。经过以上操作，可以保证两个时间点的图片取样位置相同、图片尺寸相同，具有可比性。

7.3.2 划痕面积计算

使用ImageJ软件进行划痕面积的计算。拖入要计算的图片，执行以下命令：

- Image-Type-8-bit 黑白化处理
- Process-Smooth 画面平滑
- Process-Find edges 增强边缘显示
- Process-Filters-Gaussian Blur-（Sigma值可自行设置，推荐为4）对图片进行模糊处理（上述步骤可录制为宏，一键执行）
- Image-Adjust-Threshold设置图片的阈值，直到能明显区分空白区域与细胞区域，同一批试验图片应使用相同的阈值
- 打开工具栏中的魔棒工具（Wand），选择空白区域，删除内部不需要的点，直到选中整个空白区域
- Analyze-Measure 获得区域面积数值

处理不同的划痕图片时，应使用相同的参数，或根据图片特点进行微小的调整，保证面积计算结果的重现性与可比性。

7.4 数据处理

7.4.1 计算每个观察点的迁移率，单位为百分比。进行数据筛选，在保留至少三个有效迁移率数值的前提下，删除异常值，判断依据为数据落于 平均值±（3×标准差）以外，为异常值。

7.4.2 计算阳性对照组与样品组的迁移率相对于空白对照组平均迁移率的相对迁移率，计算结果为倍数，无单位。计算每组相对迁移率数值的平均值、标准差（SD）、CV值，并计算该组迁移率相对于空白对照组的p值。

$$\text{迁移率}(\%) = \frac{0\text{h划痕面积} - 24\text{h划痕面积}}{0\text{h划痕面积}} \times 100$$

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{样品组迁移率} - \text{空白对照组平均迁移率}}{\text{空白对照组平均迁移率}}$$

8 结果判定

8.1 数据判定

通过细胞照片分析，阳性对照组或受试物组与空白对照组相比，细胞划痕面积明显减少，并且在计算得到的试验数据中体现为该组的相对迁移率与空白对照组的相对迁移率相比，具有统计学差异（ $p < 0.05$ ），说明该组样品具有促进细胞迁移的作用，表述为在本试验条件下，该浓度的受试物具有促进细胞迁移的作用，可作为化妆品修护功效宣称的证据支持；若受试物组的细胞划痕面积未明显减少，并且其相对迁移率与空白对照组相比不具有统计学差异（ $p \geq 0.05$ ），则表明该浓度的受试物在本试验条件下，不具有促进细胞迁移的作用。

8.2 成立条件

对于阳性对照组与具有促进细胞迁移能力的样品浓度组，CV值应 $\leq 30\%$ ，可认为试验成立。

8.3 结果报告

在所有试验浓度下，至少有一个浓度呈现阳性，该受试物即报告为促迁移阳性。

9 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- a) 细胞株、培养代数；
 - b) 受试物名称、剂型、剂量；
 - c) 试验步骤；
 - d) 试验数据、结论；
 - e) 试验日期；
 - f) 试验人签字。
-